SYMBOLUM SANITATIS

19 35

ВолГМУ

Вестник

ВОЛГОГРАДСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

4 (32)

ОКТЯБРЬ–ДЕКАБРЬ 2009

VOX AUDITA LATET, LITTERA SCRIPTA MANET

ИЗДАТЕЛЬСТВО ВОЛГМУ

ISSN 1994-9480

9 771994 948340

УДК 543.42.062:577.164.2

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБАХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ, НА РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Е. В. Зыкова, В. Г. Зайцев, О. В. Островский, Г. П. Дудченко

Кафедра теоретической и клинической биохимии ВолГМУ

Установлено, что сахара (моно- и дисахариды) занижают результаты количественного определения аскорбиновой кислоты, полученные с помощью титриметрического метода с 2,6-дихдорфенолиндофенолом. Дубильные вещества и флавоноиды завышают результаты количественного определения аскорбиновой кислоты фотометрическими методами с фосфорномолибденовой кислотой и ее натриевой солью. Методы, используемые для количественного определения аскорбиновой кислоты в многокомпонентных образцах, имеют погрешность.

Ключевые слова: аскорбиновая кислота, титриметрические методы, фотометрические методы, углеводы, органические кислоты, флавоноиды, дубильные вещества.

INFLUENCE OF THE CHEMICAL SUBSTANCES FROM BIOLOGICAL SAMPLES AND MEDICAL PRODUCT ON RESULTS OF DETERMINATION OF ASCORBIC ACID

E. V. Zykova, V. G. Zaitsev, O. V Ostrovskyiy, G. P. Dudchenko

Ascorbic acid has been measured with organic substances. Monosaccharide and disaccharides lowered results of measurement of an ascorbic acid in substances by 2, 6-dichlorophenol indophenol procedure. Tannins and flavonoids overestimate of measurement of an ascorbic acid by photometric methods. An experimental error of methods of measurement has been found out at presence of organic substances at sample.

Key words: ascorbic acid, photometric methods, titrimetric methods, carbohydrates, organic acid, flavonoids, tannins.

Для медицинской практики очень важным является измерение точного количества аскорбиновой кислоты (АК), которое содержится в лекарственных препаратах и биологических жидкостях. Адекватная оценка количества данного витамина в анализируемых образцах гарантирует качество лекарственных препаратов и выявление витаминодефицитных состояний, которые могут являться причиной развития серьезных патологических процессов. Однако при решении этой задачи возникает ряд аналитических проблем, главной из которых является низкое содержание АК в многокомпонентных образцах. Это предъявляет высокие требования к специфичности и чувствительности применяемых методов. Известно, что даже при использовании методов с хорошими метрологическими характеристиками возможно получение искаженных результатов. Это связано с присутствием в лекарственных препаратах, используемых для профилактики гиповитаминозов, и в биологических образцах обследуемых пациентов целого комплекса сопутствующих веществ: углеводов, органических кислот, флавоноидных и дубильных веществ, которые могут влиять на правильность определения аскорбиновой кислоты.

В просмотренной литературе мы встретили данные о влиянии лишь некоторых органических веществ на результаты количественного определения АК [3].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить влияние органических соединений, содержащихся в лекарственных препаратах и биологических жидкостях, на результаты количественного определения аскорбиновой кислоты в анализируемых образцах, измеренной различными методами.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Количественное определение АК проводили методами: титриметрическими — с использованием 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (ДХФИФ) и иодата калия (KJO_3), рекомендованными Государственной фармакопеей [2] для определения витаминов в лекарственных формах и ГОСТом 24556-89 для определения витамина С в продуктах общественного питания; колориметрическими — с использованием фосфорномолибденовой кислоты (ФМК), применяемой в международной практике для определения витаминов с восстанавливающими свойствами [4] и методом с натриевой солью (ФМ-Na), рекомендованным для сухого экстракта шиповника (ФС 42-3285-96).

В исследовании использовали аскорбиновую кислоту (ICN Pharmaceuticals, США); сахара: глюкозу (Реахим, чда) фруктозу (Реахим, чда), лактозу (Реахим, ч), мальтозу (Реахим, ч), сахарозу (Реахим, чда); органические кислоты: Na,K-тартрат (Реахим, хч), Na-оксалоацетат (Реахим, хч), Na-цитрат (Реахим, хч), яблочную и янтарную кислоты (Реахим, чда), флавоноид кверцетин (Реахим, чда); дубильные вещества: танин (Реахим, хч) и галловую кислоту (Реахим, хч).

Результаты количественного содержания АК в анализируемых пробах сравнивали с результатами, полученными в присутствии углеводов, органических кислот, флавоноидов и дубильных веществ. Углеводы добавляли к 0,46 мМ раствору АК в соотношении 1:1, 5:1 и 10:1. Органические кислоты и их соли в соотношении 1:1, кверцетин в количествах, необходимых для создания в пробе его концентрации 0,46 мМ и 2,3 мМ, танин и галловую кислоту — для создания в пробе конечной их концентрации 0,46; 2,31 и 9,2 мМ.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ STATISTICA с использованием критериев достоверности Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования влияния углеводов на количественное определение АК различными методами приведены в табл. 1 [изменения представлены в виде % относительно раствора АК (эталон)].

Из представленных данных видно, что практически все исследуемые углеводы в большей или меньшей степени искажали результаты, полученные при измерении истинного содержания АК в анализируемых пробах. Изменения заключались как в завышении, так и в занижении результатов. В каждом конкретном случае это зависело от используемого метода, химической природы углевода и его концентрации в пробе.

Исключение составила глюкоза, добавленная в низкой концентрации (0,46 мМ) к раствору АК, она не влияла на качество определения АК ни одним из используемых в данном исследовании методов. Достоверное занижение количество АК, определенное титриметрическими методами, было отмечено при добавлении в пробу глюкозы в концентрации 2,31 мМ и выше. При использовании колориметрического метода с ФМК глюкоза, содержащаяся в пробе в концентрации 2,31 и 4,62 мМ, завышала результаты определения АК. Количественное содержание АК в анализируемых пробах максимально совпадало при ее определении в отсутствии/присутствии глюкозы методом с ФМ-Na.

Фруктоза, добавленная в пробу в минимальной концентрации (0,46 мМ), завышала на 20—40 % истинное количество АК, измеренное методом с ФМ-Na. В то время как при ее добавлении к раствору АК в концентрации 2,31 мМ был зафиксирован результат снижения (примерно на 25 %) количества АК, полученного при использовании метода с ДХФИФ. При последующем повышении концентрации фруктозы в пробе до 4,6 мМ полученные всеми методами результаты оказались достоверно измененными: титрометрическими методами — занижены на 13—28 %, а колориметрическими — завышены в среднем на 40 %.

Сахароза во всех исследуемых концентрациях занижала количество АК, присутствующее и измеренное в пробе титрометрическим методом с ДХФИФ. Так, в концентрации 0,46 мМ она занижала результаты на 15 %, а в концентрации 2,31 и 4,6 мМ — на 20 и 26 % соответственно. При использовании колориметрического метода с ФМК сахароза достоверно завышала результаты, начиная с концентрации 2,31 (на 27 %). При увеличении концентрации сахарозы в пробе до 4,6 мМ погрешность определения также увеличилась, результат оказался завышенным на 33 %. Следует отметить, что результаты, полученные с использованием йодометрического титрования и метода с ФМ-Na, оказались сопоставимыми в отсутстствии/присутствии сахарозы в пробе вне зависимости от используемой концентрации.

Лактоза во всех исследованных концентрациях занижала показатели содержания АК на 10—15 % в титриметрическом методе с ДХФИФ и на 8 % в методе с йодатом калия. Колориметрические методы в присутствии лактозы имели достаточно большую погрешность измерения количества, присутствующей в пробе АК, которая, однако, не являлась статистически значимой.

Таблица 1

Влияние углеводов различной концентрации на результаты определения АК

Вещество	Содержание в пробе, мМ	Методы определения аскорбиновой кислоты			
		ДХФИФ	KJO_3	ФМ-Na	ФМК
АК (эталон)	0,46	100,0 ± 1,7	100,0 ± 2,0	100,0 ± 3,1	100,0 ± 1,3
Глюкоза	0,46	97,20 ± 1,06	99,2 ± 0,7	93,2 ± 1,1	100,2 ± 3,5
	2,31	77,60 ± 5,46*	91,8 ± 0,8*	95,0 ± 1,1	106,3 ± 0,5*
	4,62	74,6 ± 2,7*	94,4 ± 0,5*	98,9 ± 1,7	107,6 ± 0,9*
Фруктоза	0,46	95,0 ± 1,6	102,2 ± 1,4	122,3 ± 3,0*	106,8 ± 1,7
	2,31	74,1 ± 2,5*	92,90 ± 0,97	125,8 ± 2,0*	100,0 ± 5,3
	4,62	71,91 ± 2,20*	88,7 ± 1,0*	142,0 ± 3,4*	117,5 ± 0,6*
Сахароза	0,46	85,5 ± 1,2*	103,5 ± 0,4	98,9 ± 1,3	127,7 ± 9,7
	2,31	80,1 ± 2,5*	98,2 ± 1,5	98,0 ± 0,8	127,2 ± 3,8*
	4,62	73,3 ± 2,2*	93,9 ± 2,2	97,2 ± 1,2	133,2 ± 2,4*
Лактоза	0,46	79,5 ± 0,5*	107,8 ± 0,0*	97,0 ± 1,2	104,6 ± 2,4
	2,31	78,1 ± 2,0*	92,3 ± 1,7*	94,2 ± 1,6	102,9 ± 1,1
	4,62	74,6 ± 2,3*	92,9 ± 0,9*	97,8 ± 1,3	105,0 ± 1,6

* p < 0,01 по сравнению с эталоном.

Таким образом, в условиях избытка глюкозы и лактозы наиболее стабильные результаты были получены при использовании колориметрического метода с ФМ-Na, при избытке фруктозы — йодометрического титрования. В присутствии сахарозы наиболее оптимальными методами для анализа содержания АК, по результатам проведенного исследования, являются титриметрический метод с KJO_3 и колориметрический метод с ФМ-Na.

На первый взгляд, существенное занижение результатов анализа в титриметрических методах в присутствии редуцирующих сахаров (глюкозы и фруктозы) кажется труднообъяснимым, тем не менее можно предположить несколько причин, действующих по отдельности или даже совместно. Во-первых, возможно взаимодействие углеводов или продуктов их распада в кислой среде с АК, что ведет к занижению концентрации последней, во-вторых, возможно взаимодействие углеводов с ДХФИФ, и наконец, в-третьих, углеводы в высоких концентрациях могут влиять на условия протекания реакции ДХФИФ с АК.

Результаты влияния органических кислот и их солей на количественное определение аскорбиновой кислоты различными методами приведены в табл 2.

Таблица 2

Влияние органических кислот и их солей на результаты определения АК

Вещество	Методы определения аскорбиновой кислоты			
	ДХФИФ	KJO_3	ФМ-Na	ФМК
АК (эталон)	100,0 ± 1,7	100,0 ± 2,0	100,0 ± 2,7	100,0 ± 1,8
Na,K-тартрат	94,3 ± 2,7	96,7 ± 1,6	98,5 ± 1,2	97,2 ± 0,9
Na-оксалоацетат	95,3 ± 3,2	98,0 ± 1,5	97,0 ± 0,8	90,6 ± 3,4
Na-цитрат	92,9 ± 3,5	97,0 ± 1,9	97,9 ± 1,6	103,5 ± 0,9
Янтарная кислота	93,7 ± 3,6	96,9 ± 1,2	97,7 ± 1,2	99,2 ± 0,9
Яблочная кислота	92,9 ± 4,1	97,8 ± 1,5	98,2 ± 0,8	98,6 ± 2,1

* $p < 0,01$ по сравнению с эталоном.

Анализируя полученные результаты, можно утверждать, что органические кислоты достоверно не влияют на результаты количественного определения АК, измеренной всеми изученными нами методами. Следует отметить, что титрование с ДХФИФ имеет самую большую погрешность определения по сравнению с другими методами измерения АК в присутствии органических кислот.

Результаты влияния флавоноидов и дубильных веществ на количественное определение АК различными методами приведены в табл. 3 [изменения представлены в виде % относительно раствора АК (эталон)].

Таблица 3

Влияние флавоноидов и дубильных веществ на результаты определения АК

Вещество	Содержание в пробе, мМ	Методы определения аскорбиновой кислоты			
		ДХФИФ	KJO_3	ФМ-Na	ФМК
АК (эталон)	0,46	100,0 ± 3,2	100,0 ± 2,0	100,0 ± 1,2	100,0 ± 1,6
Кверцетин	0,46	99,0 ± 0,7	95,5 ± 0,47	288,0 ± 7,2*	288,7 ± 3,7*
	2,31	98,9 ± 0,4	95,6 ± 0,4	-	742,3 ± 11,7*
Галловая кислота	0,46	97,2 ± 1,3	98,2 ± 0,6	141,7 ± 2,4*	107,8 ± 3,2
	2,31	95,6 ± 1,6	91,8 ± 0,5*	162,0 ± 1,8*	122,3 ± 2,5*
	9,2	96,4 ± 1,5	92,0 ± 0,5*	-	-
Танин	0,46	100,0 ± 0,5	91,5 ± 0,4*	194,2 ± 1,7*	125,9 ± 3,6*
	2,31	95,7 ± 0,4	100,4 ± 0,5	206,0 ± 0,9*	139,7 ± 3,6*
	9,2	98,9 ± 0,6	97,5 ± 0,4	-	-

* $p < 0,01$ по сравнению с эталоном.

Как видно из приведенных данных, результаты, полученные в присутствии кверцетина, не отличаются от данных, отражающих количество АК в пробе, измеренное титриметрическими методами. В то время как присутствие флавоноида в пробах, измеренных колориметрическими методами с ФМК и ее натриевой солью, приводит к завышению регистрируемого показателя, отражающего содержания АК в пробе в среднем на 180 %.

Присутствие дубильных веществ, а именно галловой кислоты в концентрации 0,46 мМ, не влияло на результаты определения АК титриметрическими методами и методом с ФМК, а использование метода с ФМ-Na приводило к завышению результатов анализа на 40 %. Высокие концентрации галловой кислоты (от 2,31 мМ) занижали результаты йодометрического титрования. В то время как при использовании колориметрических методов с ФМК и ФМ-Na регистрировалось повышенное содержание АК — 60 и 22 % соответственно.

Танин в минимальной концентрации (0,46 мМ) завышал содержание АК, определяемое методами с ФМК и ФМ-Na, на 20 и 90 %, и занижал на 8 % при использовании йодометрического титрования. Увеличение концентрации танина в пробе приводило к резкому завышению показателей, определяемых колориметрическими методами, в то время как результаты, полученные с помощью титриметрических методов оставались достаточно стабильными. Резкое завышение показателей количественного содержания АК при использовании колориметрических методов с ФМК и ФМ-Na, возможно, связано с активным восстановлением основного реактива за счет подвижного атома водорода фенольного кольца в составе флавоноидов и дубильных веществ. Таким образом, в присутствии этих веществ более предпочтительным методом для определения аскорбиновой кислоты является титрование с ДХФИФ и KJO_3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Органические вещества, содержащиеся в анализируемых пробах, оказывают влияние на количественное определение АК всеми, изученными нами методами, что может обуславливать погрешность ее определения в многокомпонентных образцах.

На результаты количественного определения АК с помощью титриметричекого метода с ДХФИФ оказывают влияние сахара (моно- и дисахаридов). При использовании колориметрических методов с ФМК и ФМ-Na на количество АК влияют углеводы в высоких концентрациях (сахароза на метод ФМ-Na, глюкоза — на метод ФМК), флавоноиды и особенно дубильные вещества.

При необходимости определения точного количества АК для каждого типа образца необходимо учитывать его качественный состав и применять метод, который в данных условиях работает с меньшей погрешностью определения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР XI. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное сырье. МЗ ССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — 400 с.

2. Девис М., Остин Дж., Патридж Д. // Химия и биохимия. — М., 1999.

3. Рыжикова Л. Д. Сравнительная оценка влияния веществ в растениях. — М., 1999

4. Prieto P., Pineda M., Aguilar M. // Anal. Biochem. — 1999. — Vol. 269. — P. 337—341

Контактная информация

Зыкова Екатерина Владимировна — ассистент кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии ВолГМУ, e-mail: qeenkat@mail.ru.